

Aleksandra Kozera, Katarzyna Krać
Studenckie Koło Naukowe Analityków Weterynaryjnych
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Opiekun naukowy
dr hab. Joanna Wessely-Szponder, profesor uczelni

WYBRANE METODY LECZENIA OSTEOARTHRITIS, PREZENTACJA Z WYKORZYSTANIEM MODELI ZWIERZĘCYCH

Streszczenie

Osteoarthritis (OA), czyli zwyrodnieniowa choroba stawów jest najczęstszym schorzeniem stawów u ludzi. Badania nad patogenezą zwyrodnienia chrząstki oraz potencjalnymi postępowaniami terapeutycznymi są możliwe dzięki wykorzystywaniu modeli zwierzęcych, u których OA jest wywoływane w celach eksperymentalnych, lub występuje naturalnie. Najpowszechniejszymi gatunkami wykorzystywanymi do badań są kawy domowe, myszy, szczury, konie oraz psy. Stosowane obecnie terapie przy użyciu nowoczesnych preparatów oraz biomateriałów zostały opracowane z wykorzystaniem powyższych gatunków.

Wstęp

Szacuje się, że obecnie 25% osób powyżej 21 roku życia, czyli ponad 50 milionów ludzi w Stanach Zjednoczonych jest dotkniętych tą chorobą, w Europie jest to około 100 milionów osób. Osteoarthritis występuje jako następstwo postępującego oraz ciągłego niszczenia chrząstki stawowej na tle pierwotnych oraz wtórnych przyczyn. Główne objawy kliniczne obejmują przewlekły ból, niestabilność stawów, sztywność i widoczne radiologiczne zwężenie szpary stawowej.

Pomimo, że choroba zwyrodnieniowa stawów dotyka głównie osoby starsze, urazy związane ze sportem niezależnie od wieku mogą prowadzić do pourazowej choroby zwyrodnieniowej stawów (Di Chen i in., 2017). Wykazano, że pomimo najlepszej pooperacyjnej opieki, pourazowe osteoarthritis występuje u 20% do 50% pacjentów. Obecnie, poza leczeniem bólu i interwencją chirurgiczną przy zaawansowanym stadium, nie występują skuteczne metody leczenia OA.

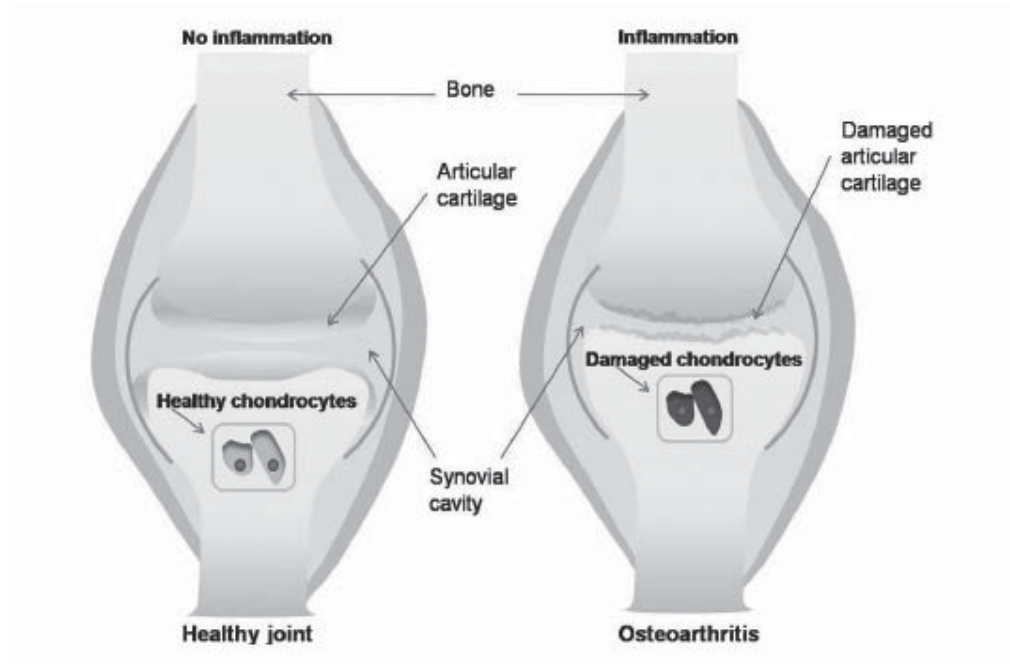
Występowanie zwyrodnieniowej choroby stawów dotyczy również zwierząt. Szacuje się że aż 20% psów powyżej 1 roku życia wykazuje pewnego stopnia zmiany zwyrodnieniowe w obrębie stawów, u kotów powyżej 12 roku życia jest to już 90% (Tilley, Smith Jr, 2020). Powszechność występowania tego schorzenia spowodowała popularyzację wykorzystywania modeli

zwierzęcych jako głównej drogi poznania patogenezy OA oraz możliwych terapii na każdym ze stadiów rozwoju choroby.

Celem niniejszego referatu jest omówienie najnowszych metod terapii osteoarthritis na przykładzie modeli zwierzęcych oraz przegląd gatunków wykorzystywanych w tym celu, określenie wad oraz zalet poszczególnych modeli zwierzęcych. Ponadto w pracy omówiono stosowane obecnie nowoczesne metody leczenia, które obejmują wykorzystanie biomateriałów oraz nowoczesnych preparatów, takich jak egzogenne czynniki wzrostu, osocze bogatopłytkowe, terapie genowe, autologiczna kondycjonowana surowica (ACS) oraz kwas hialuronowy.

Patogeneza Osteoarthritis

OA charakteryzuje się zmianami w chrząstce, kości, błonie maziowej, mazi, więzadłach, ścięgnie, torebce stawowej. W wyniku przewagi katabolizmu białek nad ich anabolizmem, dochodzi do zachwiania równowagi w syntezie kolagenu i proteoglikanów. Włókna kolagenowe przestają łączyć się z proteoglikanami. Powoduje to utratę utkania sieciowego włókien w chrząstce osłabiając jej wytrzymałość. Wskutek tego powstają szczeliny na jej powierzchni i obszary osteonekrozy. Równocześnie mediatory zapalne oddziałują na okoliczne tkanki, prowadząc do zmian w kości podchrzęstnej i błonie maziowej stawów. Chrzątka ulega zwłóknieniu, w regionach, na które oddziałuje stres mechaniczny, z towarzyszącym stwardnieniem kości i zgrubieniem błony maziowej oraz torebki stawowej. Odłamy chrzęstne ze zdegenerowanych powierzchni stawowych indukują proces zapalny błony maziowej zaburzając syntezę składników mazi, takich jak kwas hialuronowy, przez co płyn maziowy staje się mniej lepki i sprężysty, traci zdolność do nawilżania chrząstki i więzadeł. W odpowiedzi na uszkodzenie tkanek uwalniane są mediatory zapalne, takie jak interleukina-1 oraz czynnik martwicy nowotworów, które pobudzają produkcję proteinaz stawowych. Przewlekłe toczący się proces zapalny uwrażliwia odsłonięte wskutek choroby receptory. Ciągła ich stymulacja prowadzi do sensytyzacji. W konsekwencji nawet normalny bodziec może wywołać odczucie bólu. Dodatkowo zdolności naprawcze chrząstki są ograniczone ze względu na niską aktywność mitotyczną, brak zaopatrzenia naczyniowego i nerwowego oraz nieruchomość chrząstki.



Rysunek 1. Schemat zmian w chrząstce w przebiegu OA

Źródło: Manoto i in., 2016.

Cechy idealnego modelu zwierzęcego

Aby model zwierzęcy mógł być wykorzystywany w badaniu OA przebieg choroby powinien być spójny z tym u człowieka, odtwarzalny i zawarty w określonych ramach czasowych. Wywołana choroba powinna mieć charakter progresywny, aby była możliwość zbadania jej wczesnego, środkowego i późnego stadium oraz obserwacji efektów leczenia. Ponadto stosowany model powinien należeć do ssaków, być tani (względnie ekonomiczny), łatwy w utrzymaniu, wystarczająco duży aby wykonywać badania takie jak RTG, MRI (obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego), histopatologię, czy też analizę płynu maziowego. Ważnym aspektem jest również możliwość badania bólu, a ból ten powinien reagować na terapię niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi oraz lekami opioidowymi.

Proces chorobowy powinien naśladować ten u ludzi we wszystkich tkankach stawu. Ważne jest, aby leczenie choroby wyglądało identycznie u ludzi i u modelu, oraz przynosiło ten sam efekt terapeutyczny zarówno u człowieka, jak i u modelu.

Modele zwierzęce z naturalnie występującym Osteoarthritis

Kawie domowe są gatunkiem, u którego naturalne występowanie OA jest niezwykle częste, pojawia się zarówno u osobników płci żeńskiej jak i męskiej, jednak z powodu tendencji do szybszego wzrostu i bardziej efektywnego przybierania na wadze osobniki męskie są bardziej narażone.

Już 3 miesięczne i ważące 700 gramów osobniki mogą wykazywać symetryczne ubytki na środkowej plateau piszczelowej w miejscach nie chronionych przez łąkotkę, które polegają na ogniskowej śmierci chondrocytów i utracie proteoglikanu. Takie zmiany wykazano u ok 50% zwierząt w tym wieku i o tej wadze. W wieku 6 miesięcy i przy wadze 900 gramów zmiany wykazuje 90-100% zwierząt. 9 miesięczne osobniki będą posiadać łagodne do umiarkowanych ubytki w środkowej chrząstce piszczelowej, łagodne zwyrodnienie kłykcia oraz osteofity piszczeli.

Możliwe są dwa scenariusze testowania leków. Pierwszy dotyczy profilaktycznego testowania inhibitorów niszczenia chrząstki, badania rozpoczyna się kiedy kawie mają około 2,5 miesiący, kiedy wzrost stawu piszczelowego oraz chrząstki nasadowej jest wciąż niezakończony. Podawanie leków powinno zostać zakończone do 6-7 miesiąca życia zwierząt w celu obserwacji wyników.

Drugi scenariusz możliwego testowania działania leków przewiduje wykorzystanie zwierząt w wieku 4,5 miesięcy, kiedy o 75% z nich wykazano już minimalne zmiany w stawach. W tym przypadku badanie trwa do ok 9 miesiąca życia. Wykazywany jest wtedy wpływ inhibitorów na już istniejące łagodne ubytki oraz na stopień powstawania nowych

Występowanie OA u myszy lub chomików syryjskich bez względu na wiek może zostać spowodowane różnorodnymi czynnikami takimi jak: zwichnięcie rzepki, koślawość, szpotawość oraz wrodzone mutacje genetyczne, w tym mutacja w genie kolagenu typu II. Pierwsze oznaki degeneracji chrząstki wykazano już u 6 miesięcznych osobników i objawiały się one utratą chrząstki w obrębie stawu.

Zwyrodnieniowa choroba stawów jest bardzo częstym schorzeniem dotyczącym konie, szacuje się że ok. 60% kulawizn jest z nią związanych. Wśród modeli wykorzystywanych do badań nad patogenezą Osteoarthritis konie wyróżniają się dużym rozmiarem, dzięki czemu obserwacja uszkodzeń w stawach jest łatwiejsza, oraz grubością chrząstki, która jest zbliżona do ludzkiej co również przyczyniło się do zwiększenia zainteresowania końmi jako modelem badawczym. Ze względu na ich sportowe wykorzystywanie są bardziej narażone na urazy powstałe wraz z przyłożeniem dużej siły mechanicznej oddziałującej na powierzchnie stawowe dzięki czemu możliwa jest obserwacja rozwoju pourazowego OA. U koni wyścigowych Osteoarthritis występuje najczęściej w stawie śródręczno-palcowym oraz nadgarstkowym.

Modele zwierzęce z indukowanym operacyjnie Osteoarthritis

Meniscektomia, czyli częściowe usunięcie łąkotki, u królików rasy New Zealand White powoduje ubytki przypominające te występujące u ludzi chorych na OA. Króliki w odróżnieniu od myszy, szczurów i chomików obciążają tylną część stawu kolanowego. Częściowa meniscektomia w środkowej

części stawu powoduje zmiany łagodne do umiarkowanych, dzięki czemu model ten jest wykorzystywany do badania skuteczności środków chondroprotekcyjnych. Częściowe usunięcie łąkotki powoduje konkretne ogniskowe zmiany zwyrodnieniowe w około 50% tylnej piszczelowej plateau oraz kłykcia udowego.

U psów usunięcie $\frac{1}{2}$ przedniej części łąkotki u suk w wieku 2 lat lub starszych, ważących 7-11 kg powoduje rozwinięcie się umiarkowanych zmian w chrząstce kości łokciowej oraz udowej. Należy wziąć pod uwagę fakt, że psy wykazują pooperacyjnie zmiany chodu, co wpływa na wykształcanie zmian (u gryzoni nie stwierdza się zmian chodu). Jako jedną z głównych zalet wykorzystywania psów jako modeli wskazywane jest znacznie wolniejsze powstawanie ubytków w chrząstce, niż u szczurów, czy królików poddanych zabiegowi usunięcia bocznej części łąkotki.

Zabieg przecięcia przedniego więzadła krzyżowego u psa powoduje wystąpienie destabilizacji, która wpływa na pojawianie się uszkodzeń przypominających te wywołane przez OA, a po pewnym czasie powoduje pojawienie się samego OA. Zabieg ten dostarcza możliwość obserwacji powolnego rozwoju OA.

Chorobę zwyrodnieniową stawów można indukować metodami nie wymagającymi zabiegów chirurgicznych. Dobiera się je na podstawie gatunku zwierząt i predyspozycji osobniczych. Do pozostałych sposobów indukcji należy wstrzykiwanie enzymów zapoczątkowujących proces zapalny, takich jak papaina, kolagenaza, tripsyna, hialuronidaza, które jest stosowane u myszy, szczurów, królików oraz koni.

Osteoarthritis można wywołać również przez podanie dostawowe cytokin IL-1 i TGF- β (transformującego czynnika wzrostu beta) oraz iniekcję jodooctanu monosodowego (MIA), który jest inhibitorem glikolizy, odpowiada za indukowanie apoptozy chondrocytów i proces zapalny stawów.

Modyfikacje genetyczne umożliwiają wywołanie osteoarthritis wśród myszy oraz szczurów. Ponadto możliwe jest przeprowadzenie zabiegu ovariectomii u szczura, owcy oraz makaka, który bezpośrednio doprowadza do postmenopauzalnej choroby zwyrodnieniowej stawów. Jako przyczynę tego zjawiska podaje się przyrost masy oraz zmiany w budowie kości.

Tab. 1 Zestawienie wad oraz zalet najpopularniejszych gatunków modeli badawczych

Gatunek	Zalety	Wady
Mysz	Krótki okres pomiędzy indukcją a wystąpieniem objawów choroby Możliwa modyfikacja genetyczna Niskie dawki leków Znany pełny genom Mała przestrzeń życiowa Łatwe manipulacje	Ograniczona ilość tkanek i płynu do badania Ograniczone badania kliniczne i radiologiczne Brak możliwości badania bólu
Szczur	Zalety wymienione u myszy Wykazywanie objawów bólowych	Mały rozmiar stawu Ilość tkanek oraz płynu ograniczone (ale większa niż u myszy) Ograniczone możliwości diagnostyczne
Kawia domowa	Spontaniczne wystąpienie choroby u dużej liczby osobników Mała przestrzeń życiowa Łatwe manipulacje	Mały rozmiar Brak informacji o pełnym genomie
Królik	Możliwe wykonywanie zabiegów chirurgicznych Mała przestrzeń życiowa Łatwe manipulacje	Niepełne odwzorowanie choroby w odniesieniu do człowieka
Pies	Duży rozmiar modelu Możliwość tresury Poznany pełny genom (Beagle) Łatwy dostęp dla terapii wewnątrzstawowych	Emocjonalne oraz kulturowe znaczenie w wielu krajach Zmienność genetyczna
Kot	Duży rozmiar modelu oraz dostępność płynu i tkanek do badań Znany pełny genom Możliwa terapia wewnątrzstawowa	Emocjonalne oraz kulturowe znaczenie w wielu krajach Kosztowne utrzymanie Zmienność genetyczna Odmienne szlaki metabolizmu leków względem człowieka
Koń	Duży rozmiar modelu Grubość chrząstki zbliżona do człowieka	Aspekt ekonomiczny Wymóg specjalistycznego zaplecza do przeprowadzenia zabiegów chirurgicznych
Owca	Grubość chrząstki zbliżona do człowieka Łatwy dostęp do poszczególnych części stawu Duża dostępność modeli Dostępność zmodyfikowanych genetycznie szczepów	Brak informacji o pełnym genomie Występowanie żołądka wielokomorowego – brak możliwości terapii doustnych

Gatunek	Zalety	Wady
Naczelne	Genetycznie zbliżone do człowieka Rozmiar stawów zbliżony do człowieka Możliwa analiza wszystkich części stawu Poznany genom niektórych gatunków Możliwa terapia wewnątrzstawowa	Brak informacji o genomie niektórych gatunków Kosztowne badania Trudne i kosztowne pozyskiwanie modeli oraz ich utrzymywanie Emocjonalne i kulturowe znaczenie w wielu krajach

Źródło: Little, Smith, 2008.

Preparaty wykorzystywane w leczeniu osteoarthritis

Z uwagi na powszechność występowania choroby zwyrodnieniowej stawów prowadzone są ciągle badania nad nowymi metodami terapii. Dotychczas prowadzono leczenie niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi, które nie przynoszą zadowalających efektów. Do nowych metod leczenia zalicza się osocze bogatopłytkowe, które przygotowywane z autologicznej krwi osobnika leczonego, jest potencjalnym induktorem regeneracji i naprawy tkanek w obrębie stawu. Stanowi ono bogate źródło płytkopochodnych czynników wzrostu- zawiera płytkowy czynnik wzrostu, transformacyjny czynnik wzrostu beta, płytkopochodny czynnik wzrostu, czynnik wzrostu fibroblastów, insulinopodobny czynnik wzrostu, czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego oraz nabłonkowy czynnik wzrostu.

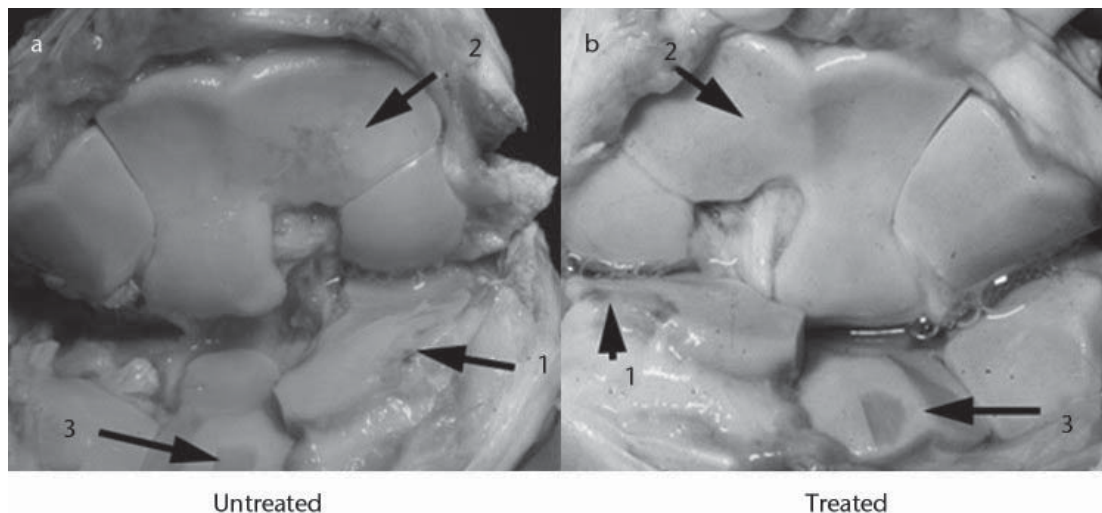
Osocze bogatopłytkowe znacznie zwiększa proliferację chondrocytów i wzmacnia różnicowanie chondrogennych komórek macierzystych, oraz poprawia formowanie chrząstki. Ponadto wpływa pozytywnie na proces naprawy ścięgien i pobudza odbudowę ubytków obecnych w kości. Może wpływać zapobiegawczo na wystąpienie OA, a jego użycie w zabiegu mozaikoplastyki chrząstki stawu kolanowego przyspiesza procesy naprawcze chrząstki, ułatwiając rekonwalescencję po operacji.

Preparatami zdobywającymi popularność w ostatnich latach są egzogenne czynniki wzrostu przynoszące korzystne efekty w odbudowie i naprawie chrząstki. Należą do nich TGF- β (transformacyjny czynnik wzrostu β), który wykazuje działanie przeciwzapalne, stymuluje produkcję kolagenu typu pierwszego, FGF (czynniki wzrostu fibroblastów), uczestniczy on w gojeniu i naprawie tkanek, stymuluje syntezę kolagenu oraz kwasu hialuronowego, PDGF (płytkopochodny czynnik wzrostu) odpowiada za regulację wydzielania kolagenazy i produkcję kolagenu, białko morfogenetyczne kości reguluje wzrost i różnicowanie chondroblastów oraz osteoklastów.

Terapia genowa z wykorzystaniem dostawowej iniekcji genu antagonisty receptora IL-1 jest jedną z najnowszych metod wykorzystywanych w leczeniu OA. Badania nad jej działaniem przeprowadzane są z wykorzystaniem koni jako modelu zwierzęcego. Uzyskane dzięki jej zastosowaniu wyniki przedstawia rycina ze zdjęciem ukazującym wpływ zwyrodnieniowej choroby stawów oraz transferu genów na erozję chrząstki

Na obu fotografiach numerem drugim zaznaczono trzecią kość nadgarstka, na której u koni nieleczonych, na zdjęciu po lewej stronie, widoczne są rozległe nadżerki chrząstki stawowej, zwłaszcza w obszarach które nie sąsiadują z fragmentem chrzęstno-kostnym zaznaczonym numerem pierwszym. U koni leczonych przy pomocy iniekcji adenowirusem-końskim zawierającym gen antagonisty receptora interleukiny-1, na zdjęciu po prawej, uszkodzenia są niezauważalne

Gen antagonisty receptora IL-1 przeniesiony z wektorem adenowirusowym po jednorazowej iniekcji wykazał silny efekt modyfikujący objawy oraz przebieg osteoarthritis. Skutkowało to znacznym obniżeniem objawów bólowych oraz aktywności choroby co można zaobserwować na zdjęciach. W przypadku leczonego stawu widać ograniczenie ubytków w chrząstce. Ze względu na zastosowany wektor adenowirusowy ponowne dawkowanie nie było możliwe, trwają prace nad opracowaniem bardziej skutecznego wektora.



Rysunek 2. Zdjęcie przedstawia środkowy staw nadgarstka. Fotografia A – nieleczony staw, fotografia B – leczony staw, 1 – fragment chrzęstno-kostny, 2 – trzecia kość nadgarstka

Źródło: Mellwraith i in., 2012.

Autologiczna kondycjonowana surowica wykorzystywana jest w terapii zarówno u ludzi jak i u zwierząt, jej działanie opiera się na wpływie cytokin oraz czynników wzrostu na chrząstkę stawową oraz błonę maziową. Powstaje poprzez pobranie krwi żyłnej do specjalnie przygotowanych

strzykawek zawierające substancje nasilające syntezę interleukin takich jak: IL-4, IL-10 oraz czynników wzrostu np. insulinopodobnego czynnika wzrostu, płytkopochodnego czynnika wzrostu, czynnika wzrostu fibroblastów, transformującego czynnika wzrostu beta. Pobrana krew inkubuje się w 37 stopniach, po kilku godzinach odwirowywuje się, po czym surowica jest gotowa do użytku.

U koni dotkniętych zwyrodnieniową chorobą stawów wstrzyknięto do stawowo ACS kolejno w dniu 14, 21, 28 i 35 po 6 ml preparatu, do stawów kontrolnych wstrzyknięto sól fizjologiczną wykorzystując taki sam schemat. Osobniki u których zastosowano ASC wykazały znaczne zmniejszenie hiperplazji błony maziowej oraz spadek tendencji do zwłóknienia chrząstki.

Pacjenci, u których zastosowanie innych metod leczenia nie przyniosło pożądanych efektów po zastosowaniu autologicznej surowicy kondycjonowanej wykazywali w 66% (cztery z sześciu) poprawę w zakresie ruchów kolanowych, 83% (pięć z sześciu) poprawę bólu i 83% (pięć z sześciu) zmniejszenie obrzęku. Każdy z nich mógł powrócić do sportu. (Mellwraith i in., 2012)

Kwas hialuronowy jest jednym z najpowszechniej wykorzystywanych preparatów w leczeniu zwyrodnieniowej choroby stawów. Kwas hialuronowy jest polisacharydem z grupy glikozaminoglikanów składającym się z naprzemiennie połączonych cząsteczek kwasu D-glukuronowego i N-acetyloglukozaminy. Kwas ten występuje naturalnie w wielu tkankach zwierzęcych: grzebieniu koguta, skórze rekina, bydlęcych gałkach ocznych i chrząstkach stawowych, mózgu i sercu królika. W organizmie człowieka występuje w płępowinie, surowicy, cieple szklistym oka, skórze właściwej, naskórku i płynie maziowym. Największa koncentracja kwasu hialuronowego jest przypisywana macierzy pozakomórkowej tkanki łącznej.

Kwas hialuronowy posiada możliwość wiązania do błonowego receptora CD44, cząsteczki adhezji międzykomórkowej i receptora CD168. Wiązanie to zapoczątkowuje sygnały międzykomórkowe, takie jak uwolnienie cytokin i pobudzenie produkcji białek komórkowych. W konsekwencji interakcje te prowadzą do migracji i proliferacji komórek. W stawach objętych osteoarthritis płyn maziowy zawiera mniejsze ilości kwasu hialuronowego w porównaniu do zdrowego stawu.

Podawanie jego egzogennych cząsteczek może przywrócić lepkość oraz sprężystość płynu. Ponadto egzogenne kwas hialuronowy może nasilić syntezę endogennego kwasu hialuronowego i proteoglikanu przez chondrocyty, zapobiegając degradacji powierzchni chrząstki. Co więcej, może redukować produkcję mediatorów prozapalnych i zapobiegać sensytyzacji zakończeń nerwowych w stawie objętym chorobą, co prowadzi do ograniczenia bólu.

Wnioski

Niniejsze opracowanie pokazuje konieczność poszerzenia wiedzy i prowadzenia badań na temat nowoczesnych metod leczenia osteoarthritis z powodu powszechności jego występowania i niezadowalających efektów dotychczasowych sposobów terapii pacjentów dotkniętych chorobą zwyrodnieniową stawów. Pokazują również kluczową rolę modeli zwierzęcych w poznawaniu patogenez OA. Dzięki wykorzystaniu poszczególnych gatunków zwierząt możliwe jest obserwowanie wszystkich stadiów choroby, zmian anatomicznych oraz histologicznych, a także procesów odpowiadających za wywoływanie bólu. Ponadto modele zwierzęce są niezbędne w opracowywaniu i testowaniu nowych metod terapii zwyrodnieniowej choroby stawów, co pozwala określić dokładne efekty terapeutyczne, które są zależne od stopnia zaawansowania choroby, skutki uboczne, a także czas utrzymywania osiągniętego rezultatu.

Piśmiennictwo:

1. Altan, E., Aydin, K., Erkocak, O., Senaran, H., & Ugras, S. (2014). The effect of platelet-rich plasma on osteochondral defects treated with mosaicplasty. *International orthopaedics*, 38(6), 1321–1328. <https://doi.org/10.1007/s00264-013-2275-9>.
2. Bendele A. M. (2001). Animal models of osteoarthritis. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions*, 1(4), 363–376.
3. Chen, D., Shen, J., Zhao, W., Wang, T., Han, L., Hamilton, J. L., & Im, H. J. (2017). Osteoarthritis: toward a comprehensive understanding of pathological mechanism. *Bone research*, 5, 16044. <https://doi.org/10.1038/boneres.2016.44>
4. Cohen-Solal, M., Funck-Brentano, T., & Hay, E. (2013). Animal models of osteoarthritis for the understanding of the bone contribution. *BoneKEY reports*, 2, 422. <https://doi.org/10.1038/bonekey.2013.156>
5. Hajduk, G., Liberski, J., Filipek, J., Ficek, K. (2018). Zastosowanie autologicznej surowicy kondycjonowanej w leczeniu choroby zwyrodnieniowej stawów i innych schorzeń narządu ruchu. *Praktyczna ortopedia/traumatologia*, <https://www.praktyczna-ortopedia.pl/artukul/zastosowanie-autologicznej-surowicy-kondycjonowanej-w-leczeniu-choroby-zwyrodnieniowej-stawow-i-innych-schorzen-narzadu-ruchu>
6. L.P. Tilley, F.W.K. Smith Jr. Tom 1 (2020). 5 minut konsultacji weterynaryjnej. *Psy i Koty*. Edra Urban&Partner s. 199-201.
7. Little, C. B., Zaki, S., Blaker, C. L., & Clarke, E. C. (2022). Animal models of osteoarthritis : the benefits and costs of reducing variability. *Bone & joint research*, 11(8), 514–517. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.118.BJR-2022-0217.R1>
8. Little, Christopher & Smith, Margaret. (2008). Animal Models of Osteoarthritis. *Current Rheumatology Reviews*. 4. 10.2174/157339708785133523.
9. Manoto, S.L., Maepa, M.J., & Motaung, S. (2016). Medical ozone therapy as a potential treatment modality for regeneration of damaged articular cartilage in osteoarthritis. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25, 672 - 679.

10. McIlwraith, C. W., Frisbie, D. D., & Kawcak, C. E. (2012). The horse as a model of naturally occurring osteoarthritis. *Bone & joint research*, 1(11), 297–309. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.111.2000132>
11. Meng, X., Ziadlou, R., Grad, S., Alini, M., Wen, C., Lai, Y., Qin, L., Zhao, Y., & Wang, X. (2020). Animal Models of Osteochondral Defect for Testing Biomaterials. *Biochemistry research international*, 2020, 9659412. <https://doi.org/10.1155/2020/9659412>